



TITLE:

Three-dimensional induction of dorsal,  
intermediate and ventral spinal cord tissues  
from human pluripotent stem cells(  
Abstract\_要旨)

AUTHOR(S):

Ogura, Takenori

---

CITATION:

Ogura, Takenori. Three-dimensional induction of dorsal, intermediate and ventral spinal cord tissues from human pluripotent stem cells. 京都大学, 2019, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2019-01-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k21452>

RIGHT:

許諾条件により本文は2019-01-30に公開; The acknowledgement should state "reproduced with permission" and give the source journal name. A link should be provided to the original article on journal website. (<http://www.biologist.com/development>)

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	小 倉 健 紀
論文題目	Three-dimensional induction of dorsal, intermediate and ventral spinal cord tissues from human pluripotent stem cells (ヒト多能性幹細胞からの背側、中間および腹側三次元脊髄組織の誘導)		
(論文内容の要旨)			
<p>脊髄組織は、多種類の介在ニューロンおよび運動ニューロンから秩序正しく構築され、その結果構成される神経回路により運動や感覚の情報処理が可能となる。近年、ヒト多能性幹細胞を用いた運動ニューロンの効率的な分化誘導は可能となったが、三次元構造を有する脊髄組織としての分化誘導はこれまでに行われていなかった。本研究では、ヒト多能性幹細胞を用いて三次元脊髄組織の分化誘導法を確立することを目的とした。</p> <p>フィーダーフリーで樹立・維持したヒト人工多能性幹（iPS）細胞を用いて、無血清凝集浮遊培養法（SFEBq 法）で三次元分化誘導を試みた。既報の運動ニューロン誘導法に含まれる多数のシグナル調整因子から、BMP シグナルの阻害剤である LDN と Sonic hedgehog シグナルを増強する SAG を除去した条件を設定し、より広い脊髄領域の分化誘導を試みた。同条件下で培養 15 日目には生体と同様のパターンを保って脊髄背側領域マーカーを発現する連続神経上皮構造が効率よく誘導され、本誘導条件を三次元脊髄誘導（3-dimensional spinal cord induction (3-DiSC)）条件と名付けた。3-DiSC 条件下では、培養 6 日目までに神経上皮構造の形成、培養 9 日目までにその連続上皮構造の一部に突起様の構造の形成を認め、突起部には脊髄最背側の蓋板のマーカーである Lmx1a の発現を認めた。同領域とその周囲には BMP シグナル下流のマーカーや Wnt1 の発現を認め、生体の蓋板と同様に、Lmx1a 陽性の領域がオルガナイザーとして機能し、複数の背側脊髄領域が自己組織化的に形成されることが示唆された。</p> <p>次に発生学的知見に基づいて誘導領域の調整を試みた。3-DiSC 条件下では培養 24 日目に背側介在神経（dI）1-4 に相当する細胞が産生されたが、培養 15 日目から背側化因子の BMP4 を添加すると、最背側の dI1 の割合が有意に上昇する一方で dI3,4 の割合が有意に低下し、誘導領域が背側化されることが示された。次に、3-DiSC 条件に腹側化を促進する SAG を培養 3 日目から 50 nM と 500 nM の濃度で添加したところ、培養 15 日目の qPCR で脊髄背側マーカーの発現が両条件下で抑制され、SAG 50 nM を添加した条件では脊髄中間領域のマーカー、SAG 500 nM を添加した条件では脊髄腹側領域のマーカーの発現が上昇した。免疫染色で、それぞれの条件下で連続上皮構造の中に脊髄中間および腹側領域のマーカーが秩序正しく発現することを認め、誘導した脊髄組織は濃度依存的に腹側化されることが示された。さらに、SAG 50 nM を添加した条件下では、培養 24 日目に V2a、V2b と 2 種類の V2 介在ニューロンに相当する細胞を認めたが、培養 15 日目から notch シグナルを抑制する DAPT を添加すると V2a の割合が有意に上昇し、両者の分化は生体と同様に notch シグナル依存性に決定されることも示された。</p> <p>最後に、得られた神経細胞の単細胞でのマーカー発現を確認するため、3-DiSC 条件、SAG 50 nM および SAG 500 nM を添加した条件で分散培養を行うと、</p>			

<p>それぞれの分化誘導領域に相当する種類の脊髄介在ニューロン、運動ニューロンが産生され、いずれも生体と同様の組み合わせで神経伝達物質を発現することが示された。</p> <p>本研究はヒト脊髄の発生過程を再現する形で三次元脊髄組織の分化誘導を可能とし、将来的なヒト脊髄の発生研究や脊髄関連疾患の研究に貢献すると考えられた。</p>			
<p>(論文審査の結果の要旨)</p> <p>ヒト多能性幹細胞を用いた脊髄運動ニューロンの分化誘導法はこれまで多数報告されているが、その他介在ニューロンを含む三次元脊髄組織としての分化誘導法はこれまで十分に確立されていなかった。本研究では、ヒト人工多能性幹細胞（iPS）細胞を用いて、無血清凝集浮遊培養法（SFEBq 法）で三次元脊髄組織を分化誘導できる条件が検討された。既報の運動神経の誘導法から BMP シグナル阻害剤と Shh シグナル活性化剤を除去した条件を設定することにより、生体と同様のパターンを保って脊髄背側マーカーを発現する連続神経上皮構造が効率よく誘導され、背側の蓋板に相当するオルガナイザーも同時に誘導されることが示された。こうして得られた背側脊髄様組織からは、各種背側介在ニューロンに相当する細胞が産生され、かつ BMP4 添加により誘導領域がさらに背側化されることが示された。また、腹側化因子である Shh シグナルを添加することにより、濃度依存的に脊髄様組織が腹側化され、中間および腹側脊髄に相当する組織が誘導されることが示された。最後に、得られた脊髄様組織を分散培養することにより、脊髄介在ニューロンおよび運動ニューロンが産生され、生体と同様の組み合わせで神経伝達物質を発現することが確認された。以上の研究は、発生過程を再現する形での脊髄組織の三次元誘導法の解明に貢献し、ヒト脊髄の発生研究や脊髄関連疾患の研究に寄与するところ大きい。</p> <p>したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、平成30年12月28日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>			
<p>要旨公開可能日：                      年                      月                      日 以降</p>			